

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
（総括）研究報告書
「環境中における薬剤耐性菌及び抗微生物剤の調査法等の確立のための研究」

研究代表者 金森 肇 東北大学大学院医学系研究科 総合感染症学分野 准教授

研究要旨

国内外の河川・下水等の環境から薬剤耐性因子が検出され、環境中の薬剤耐性への関心が高まっている。環境水中の薬剤耐性がヒト及び動物に及ぼす影響に関する定まった見解はなく、環境水中の薬剤耐性や残留抗菌薬のサーベイランス手法は確立されていない。環境水における薬剤耐性の調査法を確立し、日本の環境水中の薬剤耐性菌及び残留抗菌薬の実態調査を実施することで、環境水の薬剤耐性リスクを評価する必要がある。令和5年度の研究課題である 1)環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価、2)薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー、3)環境微生物ゲノム情報の取得、4)大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離、5)環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価、6)残留抗菌薬の調査方法の確立と評価、7)環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響に関する研究を継続した。環境 AMR モニタリングに資する作業手順書を確立し、さらに全国展開するための体制が整備された。下水処理場放流水の全国的なサーベイランスの継続、地域におけるメタゲノム解析および培養法による環境水中の薬剤耐性モニタリングは、薬剤耐性因子の全体像を理解し、薬剤耐性の実態把握に必要と考えられた。環境水の抗菌薬の測定法と抗菌薬濃度の推計法は環境水中の抗菌薬の調査方法を確立するための基礎データを提供した。本研究班の研究結果および文献レビューをもとに、日本における環境水中の薬剤耐性および抗菌薬の実態調査を継続し、薬剤耐性ワンヘルスの観点から薬剤耐性対策を推進していくことが重要である。

研究分担者

松永 展明	国立国際医療研究センター病院 AMR 臨床リファレンスセンター 臨床疫学室長
黒田 誠	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター センター長
山口 進康	大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部生活環境課 課長
楠本 正博	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 人獣共通感染症研究領域 腸管病原菌グループ グループ長
渡部 徹	山形大学 農学部 教授
東 剛志	大阪医科薬科大学 大学院薬学研究科 助教

A. 研究目的

国内外の河川・下水等の環境から薬剤耐性因子が検出され、薬剤耐性ワンヘルスの観点から環境の薬剤耐性対策への関心が高まっている。環境水中の薬剤耐性がヒト及び動物に及ぼす影響に関する定まった見解はなく、環境水中の薬剤耐性や残留抗菌薬のサーベイランス手法は確立されていない。環境水における薬剤耐性の調査法を確立し、日本の環境水

中の薬剤耐性菌及び残留抗菌薬の実態調査を実施することで、環境水の薬剤耐性リスクを評価する必要がある。

令和5年度においては、環境水中の薬剤耐性および抗菌薬の標準的な調査法を確立し、本邦の環境 AMR に関する動向調査を進めていく。本研究班では、1) 環境中の薬剤耐性菌のヒト及び動物へのリスクや曝露に対する介入の有効性についての国内外の資料を収集し、文献レビューを実施する。2) 環境水の薬剤耐

性を評価するための方法を確立する。3) サーベイランスを継続し、本邦における環境水の薬剤耐性菌及び抗菌薬の実態を調査する。4) 環境中の薬剤耐性菌のゲノム情報を解析し、本邦の臨床・家畜由来薬剤耐性菌のゲノム情報データベースと比較検討することで薬剤耐性ワンヘルス・アプローチの完成を図る。5) 本研究結果を統合し、環境中の薬剤耐性や抗菌薬がヒト及び動物へ与える影響についてリスクアセスメントを行う。

B. 研究方法

令和5年度において、環境中の薬剤耐性及び抗菌薬の調査法の確立に向けた研究を行い、日本における環境水の薬剤耐性の実態調査を実施した。また、環境中の薬剤耐性がヒトに与える影響を検討するため、文献レビューとリスクアセスメントを行った(図1)。

本研究班における研究代表者及び研究分担者は、各研究課題である1) 環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価(金森)、2) 薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー(松永)、3) 環境微生物ゲノム情報の取得(黒田)、4) 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離(山口)、5) 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価(楠本)、6) 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価(渡部)、7) 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響(東)を担当した。研究方法と結果の詳細は各分担研究報告書を参照されたい。

(倫理面への配慮)

本研究は環境中における薬剤耐性の調査法を確立するための研究であり、環境由来のサンプルを解析対象とした。個人情報を取り扱う一部の研究においては、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に基づき、当該研究を実施する施設の倫理委員会で審査・承認を得てから実施した。微生物ゲノムデータの取り扱いに関しては、セキュリティ対策を実施し、データを公表する際に個別の施設名が特定できないように配慮した。

1. 環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価

病院・市中下水からカルバペネム耐性菌を検出した。また、成人患者の病院下水の薬剤耐性遺伝子についてメタゲノム法及びマルチプレックス・ハイブリッドキャプチャー法(xHYB)による評価を行い、薬剤耐性菌検出患者数との比較検討を行った。さらに、選択培地を用いて小児患者の病院下水から薬剤耐性菌の検出を試みた。

2. 薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー

一般環境由来の薬剤耐性菌がヒトや家畜の感染症に及ぼす影響に関する文献データベースを構築し、環境由来の薬剤耐性菌がヒトや家畜の感染症に及ぼす影響について文献の情報収集および評価を行った。国内外の文献情報をもとにレビューを実施した。環境・ヒト・動物由来の薬剤耐性及び残留抗菌薬に関する本研究成果を解釈し、リスクアセスメントを実施した。

3. 環境微生物ゲノム情報の取得

下水処理場の放流地点から放流水原液を採水し、次世代シーケンサー(NGS)を用いたメタゲノム解析による生物種および薬剤耐性因子の配列同定までの方法を検討した。解読リードをMePIC2メタゲノム解析ツールで生物種を分類と検出数を算出し、サンプル毎の多様性をMEGANツールで評価した。RPKM(Reads Per Kilobase of gene per Million mapped reads)法を採用して相対的なARG濃度を算出し、検体間の比較解析を実施した。

4. 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離

大阪府内における環境水中の薬剤耐性遺伝子の把握および薬剤耐性菌の分離を行った。また、環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子の全国的なサーベイランスを行うために、地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所(地衛

研)に研究協力を依頼し、環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスを実施した。

5. 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価

養豚場の原尿槽から収集した水試料より昨年度に分離した四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌について、四級アンモニウム耐性遺伝子 (*qac*) およびサルファ剤耐性遺伝子 (*sul*) の両方を保有する菌株群から代表株を選抜した。選抜株について、S1 ヌクレアーゼを用いたパルスフィールドゲル電気泳動 (S1-PFGE) を行い、*qacE* および *sul1* をそれぞれプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析により、両遺伝子の局在を確認した。

6. 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価

(1) 残留抗菌薬検出手法が実河川での調査に適用可能か検討し、河川水中の残留抗菌薬の検出頻度や濃度に対する都市下水や畜産排水の影響を調べるための現地調査を実施した。山形県内の都市下水処理場からの放流水を受容する河川の3地点から河川水を採取した。採取した水試料中の10種類の抗菌薬について、固相抽出法を用いた前処理の後、高速クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) 計で検出し、さらに簡易定量した。(2) 河川底質に蓄積している抗菌薬の存在にも着目し、(1)と同じ3地点から底質を採取し、その間隙水中の抗菌薬濃度を(1)と同じ手法で検出と簡易定量を行った。

7. 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響

下水処理場の流入水を用いた環境水中の残留抗菌薬のハイスループット測定解析法を検討した。また、手作業によるマニュアル測定系での環境水中の残留抗菌薬の測定、自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系による環境水中の残留抗菌薬の測定条件を検討した。

C. 研究結果

1. 環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価

(1) 病院・市中下水由来のカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 21 株およびカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌 16 株のゲノム解析を行った。

(2) xHYB AMR panel を用いて病院排水の薬剤耐性遺伝子を網羅的に探索し、研究分担者・黒田誠と連携し、従来のメタゲノム分析結果と比較検討した。xHYB によって検出された ARG の平均 RPKM 値は、mDNA-seq と比較し著明に高かった。

(3) 小児患者の病院下水から ESBL 産生腸内細菌目細菌 47 株を検出した。

2. 薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー

(1) 海外渡航による ESBL 伝播リスクの Systematic Review を行い、アジアとアフリカ渡航がリスクであることを明らかにした。また、ESBL 血流感染症に対するセファマイシン治療とカルバペネム治療の予後については、有意差を認めなかった (オッズ比 [OR] 1.87; 95%信頼区間 [CI] 0.98-3.56, p=0.10)。

(2) 環境水からヒトへの薬剤耐性菌伝播リスクの Scoping Review を行い、環境水からヒトへの直接リスクを明らかにした。

(3) 下水処理場放流水のメタゲノム解析と抗菌薬使用量などの関係性を、相関プロットやクラスタリング解析にて検討し、リスク評価を行った。

3. 環境微生物ゲノム情報の取得

(1) 2018 年夏から 2023 年夏まで年 2 回の計画で、44 自治体の水再生センター処理放流水をメタゲノム解析し (計 515 サンプル)、薬剤耐性遺伝子の年次・季節変動を定量的に評価した。

(2) 2020 年冬以降から新型コロナウイルス発生の影響と推定される ARG の増減が確認された。サルファ剤耐性遺伝子が 2020 年冬ま

では増加傾向であったところ、2020年夏で顕著な減少を示し、2022年夏までの2年間は低い水準を維持していた。マクロライド耐性遺伝子は2020年冬に減少傾向を示したが、2022年冬では新型コロナウイルス発生以前の水準にまで増加した。

4. 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離

- (1) 水環境中の耐性菌培養法の標準化に向けて、培養法を改良し、従来法との比較検討を行い、効率的に分離培養ができることを確認した。各種βラクタマーゼ産生遺伝子を保有する腸内細菌目細菌を分離した。
- (2) 国内の全地方衛生研究所に対して「大都市圏の環境水調査」に関する研究協力を依頼し、計42機関との連携を構築した。

5. 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価

- (1) 養豚場では原尿槽（豚の排泄物と農場の消毒液が流入し、処理開始まで保管する場所）において消毒剤（特に四級アンモニウムおよびサルファ剤）の耐性遺伝子が増加していることを見出した。
- (2) 原尿槽から分離した四級アンモニウムおよびサルファ剤耐性菌（各菌種代表株）の多くで染色体上に耐性遺伝子が認められた。*Pseudomonas caeni* と *Brucella grignonensis* では類似サイズのプラスミドに耐性遺伝子が局在したが、耐性遺伝子の大腸菌への伝達は確認できなかった。

6. 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価

- (1) 昨年度まで河川水に対して適用可能性を確認した残留抗菌薬検出手法を用いて、河川水とともに河川底質に含まれる抗菌薬のデータを得た。
- (2) (1)のデータをもとに、河川水中と底質中の残留抗菌薬の関連や、両者に対する都市下水や畜産排水の影響、そして、同地点から分離された大腸菌の薬剤耐性との関わりについて検討を行った。

7. 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響

- (1) 都市圏の河川と下水処理場を対象に、抗菌薬の実態調査を行った。調査を継続して、知見の収集に努めた。
- (2) 環境中に残留する抗菌薬濃度の推定方法について、調査方法の標準化に向けたハイスループット解析についての評価検討を試みた。手動によるマニュアル測定をもとに、自動分注装置を用いたハイスループット測定系の各種測定条件、LC-MS/MS測定時における最終溶媒の溶媒組成における各抗菌薬のピーク強度の影響について検討を行った。

D. 考察

1. 環境中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスク評価

市中下水や、大学病院や小児病院における臨床と病院下水のESBL-EやCPE等臨床的に重要な薬剤耐性菌のゲノム解析を実施した。また、xHYBによる病院排水中のARGのモニタリングは、従来のmDNA-seqと比較し、*bla*_{CTX-M}や*bla*_{IMP}等の感染対策上重要なARGの検出に有用と考えられた。下水中の薬剤耐性の調査法を確立し、下水中のAMRモニタリングの実施により、市中や臨床におけるAMRの伝播拡散の状況を理解し、下水中の薬剤耐性のヒト感染症へのリスクを明らかにする必要がある。

2. 薬剤耐性ワンヘルスのデータ比較解析と文献レビュー

海外渡航によるESBL伝播リスクについては、アジアへの渡航とアフリカへの渡航がリスク因子であり、海外渡航の際に薬剤耐性菌を持ち込まない注意喚起を行う上で、有用な文献データと考えられた。薬剤耐性菌の環境水からヒトへの感染を示すエビデンスとしては、疫学的リスク評価の分析が最も多かった。ESBLに対するセファマイシン系抗菌薬の有効性については、全体でセファマイシンがカ

ルバペネムに劣らない結果を認めたことは、薬剤耐性菌感染症の治療選択が増える観点から重要と考えられた。

3. 環境微生物ゲノム情報の取得

本研究班のメタゲノム解析法は世界的なメタゲノム解析法に準じたものであり、各国からの報告と比較する上においても重要なデータを提供している。下水処理場の放流水に係る環境 AMR を調査した国内外文献は少数ではあるが、汚染リスクに係る実態の報告が増えつつある。本邦でも定量的な環境調査をもってデータ収集し、環境負荷とそのリスクについて適正に評価できるよう体制を整備していく必要がある。

4. 大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の分離

フィルターを用いて前培養後、培養する方法がより効率的に目的とする菌を検出可能であった。分離培養で得られた株は CRE 株よりも ESBL 株が多く、医療機関での検出状況と一致していたことから、培養法を用いた薬剤耐性菌の分離は、地域の状況を把握するための指標となりうる。また、環境水中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスの実施において、計 42 機関より環境中の薬剤耐性菌および耐性遺伝子の現状を把握するためのデータが得られた。これらのデータ解析により、日本の環境中の薬剤耐性がヒトおよび動物へ与えるリスクの評価に寄与しうる。

5. 環境中の薬剤耐性の動物由来感染症へのリスク評価

原尿槽において四級アンモニウム耐性遺伝子 *qac* やサルファ剤耐性遺伝子 *sul* が Proteobacteria 門や Actinobacteria 門の細菌に偏在していた。今年度の検討の結果、原尿槽由来株のうち *qac* および *sul* 陽性プラスミドを保有する菌株はブルセラ属 (Proteobacteria 門) の 2 株のみであり、両株において *qac* および *sul* 陽性プラスミドの

大腸菌への伝達性は確認できなかった。農場での消毒剤の使用などにより環境 (養豚場の原尿槽) で選択された *qac* や *sul* を保有する耐性菌が農場内での循環を介して動物 (豚) に影響を与えるリスクは低いと考えられた。

6. 残留抗菌薬の調査方法の確立と評価

河川水中の残留抗菌薬に関する調査結果は、過去 2 年間と同様であった。すなわち、下水処理場の放流口付近の河川では、放流水の影響を強く受けるために、放流水で安定的に検出される抗菌薬が検出された。一方、放流口付近以外では、抗菌薬が検出されることは稀であり、大腸菌の薬剤耐性との関連は明確でなかった。抗菌薬が長期に渡って蓄積される可能性がある底質からの残留抗菌薬の検出も試みたが、河川水よりもさらに抗菌薬の検出が困難であった。今後は、底質と吸着して存在する抗菌薬についても検出できるよう、前処理方法の高度化が必要と考えられる。

7. 環境中の抗菌薬の調査と薬剤耐性への影響

国環境水中の残留抗菌薬濃度の評価測定について、迅速・大量解析を可能とする自動分注装置と自動固相抽出前処理装置を組み合わせ駆使するハイスループット測定系が薬剤耐性菌と残留抗菌薬をあわせた全国規模でのモニタリング調査を検討する上で有効な手法となりうる可能性を示唆された。

E. 結論

環境 AMR モニタリングに資する作業手順書を確立し、さらに全国展開するための体制が整備された。下水処理場放流水の全国的なサーベイランスの継続、地域におけるメタゲノム解析および培養法による環境水中の薬剤耐性モニタリングは、薬剤耐性因子の全体像を理解し、薬剤耐性の実態把握に必要と考えられた。環境水の抗菌薬の測定法と抗菌薬濃度の推計法は環境水中の抗菌薬の調査方法を確立するための基礎データを提供した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1. 金森肇. シンポジウム 2 「AMR 対策と新アクションプラン 2023-2027」 AMR 対策とワンヘルス. 第 72 回日本感染症学会 東日本地方会学術集会 第 70 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会, 東京, 2023 年 10 月
2. 金森肇. 薬剤耐性ワンヘルス: 環境からのアプローチ. 第 26 回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会, 横浜, 2023 年 9 月
3. 馬場啓聡, 黒田誠, 関塚剛史, 金森肇. マルチプレックス・ハイブリッドキャプチャー法による病院排水中の薬剤耐性遺伝子の検出. 第 38 回日本環境感染学会・学術集会, 横浜, 2023 年 7 月
4. Baba H, Kuroda M, Sekizuka T, Kanamori H. Deep detection of antimicrobial resistance genes in hospital wastewater using the multiplex hybrid capture method. IDWEEK 2023, October 11-15, 2023, Boston, MA, US.

論文発表

1. Baba H, Kuroda M, Sekizuka T, Kanamori H. Highly sensitive detection of antimicrobial resistance genes in hospital wastewater using the multiplex hybrid capture target enrichment. mSphere. 2023 Aug 24;8:e0010023.
2. Sekizuka T, Yamaguchi N, Kanamori H, Kuroda M. Multiplex Hybrid Capture Improves the Deep Detection of Antimicrobial Resistance Genes from Wastewater Treatment Plant Effluents to Assess Environmental Issues. Microb Drug Resist. 2023;29:510-515.

3. Azuma T, Katagiri M, Sekizuka T, Kuroda M, Watanabe M. Performance of a pilot-scale continuous flow ozone-cased hospital wastewater treatment system. Antibiotics. 2023;12:2023.
4. Azuma T, Usui M, Hayashi T. Inactivation of antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater by ozone-based advanced water treatment processes. Sci Total Environ. 2024;906:167432.
5. 東 剛志. 環境水・医療排水中の抗菌薬及び薬剤耐性菌の実態と不活化法の開発. 獣疫学雑誌. 2023;27:9-16.
6. 東 剛志, 林 哲也. 薬剤耐性とワンヘルスーオゾン処理の有効性についてー. 相愛大学研究論集. 2023;39:17-26.
7. 東 剛志. 大阪の水環境 淀川中下流・支川における抗菌薬および薬剤耐性菌による環境問題への取り組み. 水環境学会誌. 2023;46:240-244.

その他発表

1. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2023. (4)環境.
2. 安達史恵, 山口進康, 河原隆二. 環境水から分離されたカルバペネマーゼ産生菌の遺伝学的特徴. 第 58 日本水環境学会, 2024 年 3 月
3. 東 剛志, 関塚剛史, 黒田 誠, 片桐美和, 渡邊 学. 医療機関に由来する排水処理へのオゾンの応用. オゾンの利活用事例集 追補版. 日本医療・環境オゾン学会 環境応用部会/オゾン水研究会. 2023;36-40.
4. 東 剛志. 環境水・医療排水中の抗菌薬及び薬剤耐性菌の実態と不活化法の開発. 第 61 回獣疫学会学術集会 シンポジウム「薬剤耐性問題: ヒト・動物・環境のインターフェイス」, 日本獣医畜産大学, 2023 年 3 月 (招待講演)
5. 東 剛志, 白井 優, 林 哲也. 医療機関に由来する排水高度処理へのオゾンの応用. 日本オゾン協会 第 32 回年次研究講演会, 東京都立大学, 2023 年 6 月 (招待講演)

6. 東 剛志. 医療機関に由来する排水高度処理へのオゾンの応用. 日本オゾン協会 第 40 回オゾン技術に関する講習会・見学会, 仙台, 2023 年 12 月 (招待講演)
 7. Saito S, Watanabe T, Nishiyama M. In vitro experiment to evaluate persistence of coliform bacteria producing extended-spectrum β -lactamase and conservation of relevant genes. Water and Environment Technology Conference 2023 (WET2023), Online, July 8-9, 2023.
 8. Nishiyama M, Mori M, Yoneda I, Watanabe T. Distribution and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a river basin in Yamagata prefecture, Japan. 9th IWA-ASPIRE Conference and Exhibition 2023, Kaohsiung, Taiwan, October 22-26, 2023.
 9. 西山正晃, 劔持ひろ, 森祐哉, 米田一路, 渡部徹. 東北地方の一級河川から単離した ESBL 産生大腸菌の時空間分布. 第 26 回日本水環境学会シンポジウム, 大阪, 2023 年 9 月
 10. 齋藤静香, 渡部徹, 西山正晃. In vitro 実験における ESBL 産生腸内細菌科細菌の生残性と耐性遺伝子の保存性の評価. 日本水処理生物学会第 59 回大会 (山形大会), 鶴岡, 2023 年 11 月
 11. 齋藤静香, 渡部徹, 西山正晃. In vitro 実験による ESBL 産生腸内細菌科細菌の生残性と耐性遺伝子の保存性の評価. 第 58 回日本水環境学会年会, 福岡, 2024 年 3 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- なし

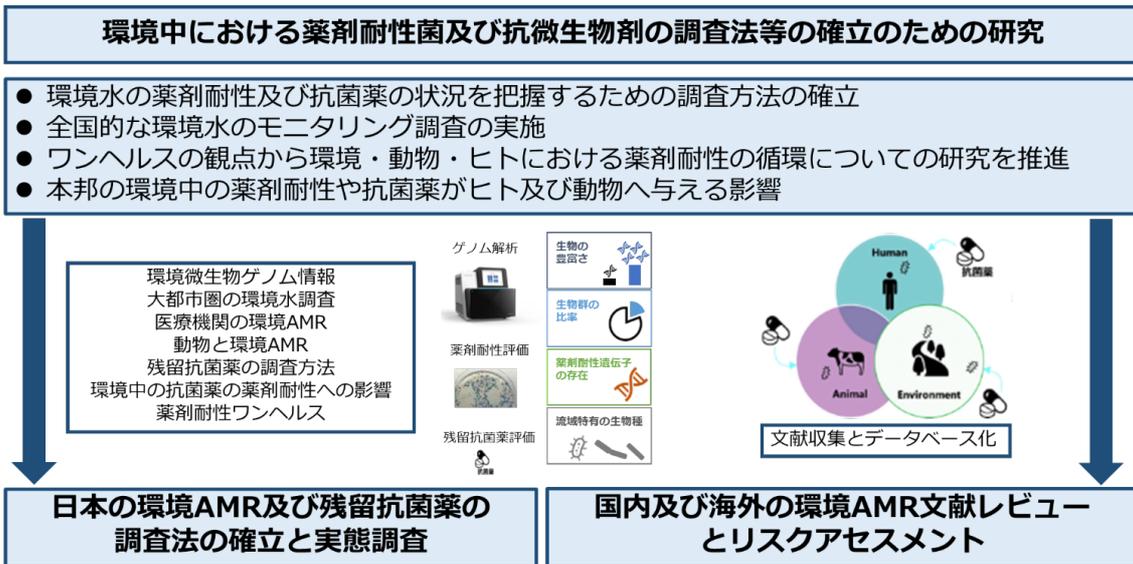


図1 環境中における薬剤耐性菌および抗微生物剤の調査法等の確立のための研究